

CE

RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV

REF PG0004



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Niemcy \$+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com

1. Przeznaczenie

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*. RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV służy do kalibracji kolorów dupleksowych i wyższych cykli RIDA[®]GENE real-time PCR na urządzeniu LightCycler[®] 480 II. RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV można użyć do wygenerowania pliku kompensacji koloru, aby umożliwić analizę jakościowych i ilościowych dupleksowych i wyższych test RIDA[®]GENE real-time PCR na aparacie LightCycler[®] 480 II.

Produkt ten jest przeznaczony do użytku profesjonalnego.

2. Podsumowanie i wyjaśnienie testu

W reakcji PCR w czasie rzeczywistym wyemitowany fluorescencyjny sygnał fluorescencyjnego barwnika reporterowego może nakładać się na sąsiedni kanał koloru, generując w ten sposób sygnał (przenik). Przenik z sygnałów fluorescencyjnych może powodować nieprawidłowe wyniki, chyba że korekcja jest wykonywana za pomocą pliku kompensacji koloru. Plik kompensacji kolorów może kompensować przeniki między kanałami koloru.

3. Zasada testu

RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV służy do kalibracji koloru dupleksowych i wyższych cykli RIDA[®]GENE real-time PCR na aparacie LightCycler[®] 480 II.

4. Dostarczane odczynniki

Tabela 1:Dostarczone odczynniki (Odczynniki dostarczone w zestawie wystarczają na
3 cykle kompensacji koloru.)

Kod zestawu	Odczynnik		lość	Kolor pokrywki
1	Blank	1 ×	400 µL	biały, gotowy do użycia
2	Dye 1	1 ×	400 µL	niebieski, gotowy do użycia
3	Dye 2	1 ×	400 µL	zielony, gotowy do użycia
4	Dye 3	1 ×	400 µL	żółty, gotowy do użycia
5	Dye 4	1 ×	400 µL	pomarańczowy, gotowy do użycia
6	Dye 5	1 ×	400 µL	czerwony, gotowy do użycia

5. Instrukcje dotyczące przechowywania

- Należy postępować zgodnie z wytycznymi dotyczącymi postępowania przedstawionymi w Tabeli 2 i przechowywać zestaw bezpośrednio po użyciu zgodnie z podanymi informacjami.
- Wszystkie odczynniki należy przechowywać z dala od światła w temperaturze od -16°C do -28°C. Nieotwarte odczynniki można zużyć do terminu ważności wydrukowanego na etykiecie. Po upływie terminu ważności nie można dłużej zagwarantować jakości.
- Wszystkie odczynniki należy ostrożnie rozmrozić przed użyciem (np. w lodówce w temperaturze 2–8°C).
- Wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie do 3 razy nie wpływa na właściwości testu.
- Podczas przygotowywania PCR należy odpowiednio schłodzić wszystkie odczynniki (2–8°C).

	Temperatura przechowywania	Maksymalny czas przechowywania
nieotwarte	od -16°C do -28°C	Można zużyć do wydrukowanego terminu ważności
po otwarciu	od -16°C do -28°C	3 cykli rozmrażania/zamrażania

Tabela 2: Warunki przechowywania i informacje

6. Odczynniki wymagane, ale niedostarczane

6.1 Odczynniki

Brak.

6.2 Sprzęt laboratoryjny

Do przeprowadzenia testu RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV potrzebny jest następujący sprzęt:

Sprzęt

Aparat do PCR w czasie rzeczywistym: LightCycler[®] 480 II (Roche)

Materiały eksploatacyjne do PCR w czasie rzeczywistym (płytki (niskoprofilowe, białe studzienki, przezroczysta ramka), fiolki reakcyjne, filmy)

Wirówka z rotorem do płytek/fiolek reakcyjnych

Worteks

Pipety (0,5–20 µL, 20–200 µL, 100–1000 µL)

Tipsy do pipet z filtrami

Jednorazowe rękawiczki bezpudrowe

W przypadku pytań należy skontaktować się z firmą R-Biopharm AG pod adresem pcr@r-biopharm.de.

7. Ostrzeżenia i środki ostrożności dla użytkowników

Wyłącznie do diagnostyki in vitro.

Ten test może być wykonywany wyłącznie przez wykwalifikowany personel laboratoryjny. Należy przestrzegać wytycznych dotyczących pracy w laboratoriach medycznych. Podczas wykonywania tego testu należy zawsze ściśle przestrzegać instrukcji użycia Nie pipetować próbek ani odczynników ustami. Unikać kontaktu z uszkodzoną skórą i błonami śluzowymi.

Podczas pracy z odczynnikami i próbkami należy nosić osobiste wyposażenie ochronne (odpowiednie rękawiczki, fartuch laboratoryjny, okulary ochronne), a po wykonaniu testu - umyć ręce.

W miejscu, w którym przetwarzane są próbki nie wolno palić, jeść ani pić.

Aby zapobiec przeniesieniu zakażenia i uzyskaniu wyników fałszywie dodatnich, należy używać oddzielnych pomieszczeń, specjalnej odzieży i narzędzi do ekstrakcji, przygotowywania PCR i PCR.

Próbki kliniczne należy traktować jako potencjalnie zakaźne i odpowiednio je zutylizować, podobnie jak wszystkie odczynniki i materiały, które mają kontakt z potencjalnie zakaźnymi próbkami.

Nie używać zestawu po upływie terminu ważności. Użytkownicy ponoszą odpowiedzialność za prawidłową utylizację wszystkich odczynników i materiałów po użyciu. W przypadku utylizacji należy przestrzegać przepisów krajowych.

Dalsze szczegóły dotyczące karty charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) można znaleźć pod numerem pozycji na stronie https://clinical.r-biopharm.com/search/.

Dotyczy użytkowników w Unii Europejskiej: Wszystkie poważne zdarzenia niepożądane związane z produktem należy zgłaszać firmie R-Biopharm AG oraz odpowiednim organom krajowym.

8. Protokół do generowania pliku kompensacji koloru w aparacie LightCycler[®] 480 II

8.1 Przygotowanie kompensacji koloru

Rozmrozić, wymieszać i krótko odwirować odczynniki przed użyciem. Zawsze schładzać wszystkie odczynniki podczas etapów pracy (od 2°C do -8°C). Aby przeprowadzić cykl kompensacji koloru, należy odpipetować pięć reakcji z 20 µL każdego barwnika, w tym tło (Blank), na płytkę mikrotitracyjną (Rys. 1).



Rysunek 1: Schemat pipetowania do kompensacji koloru w aparacie LightCycler® 480 II.

Kod zestawu	Odczynnik	llość na reakcję	Odpipetować po 20 µL w następujących studzienkach
1	Blank	20 µL	B2, C2, D2, E2, F2
2	Dye 1	20 µL	B4, C4, D4, E4, F4
3	Dye 2	20 µL	B6, C6, D6, E6, F6
4	Dye 3	20 µL	B8, C8, D8, E8, F8
5	Dye 4	20 µL	B10, C10, D10, E10, F10
6	Dye 5	20 µL	B12, C12, D12, E12, F12

 Tabela 3:
 Przygotowanie kompensacji koloru dla aparatu LightCycler[®] 480 II

Po odpipetowaniu odczynników należy uszczelnić płytkę mikrotitracyjną folią optyczną i, jeśli to możliwe, odwirować. Rozpocząć PCR w czasie rzeczywistym zgodnie z ustawieniami urządzenia.

8.2 Konfiguracja aparatu do PCR

- *Uwaga:* Zalogować się do oprogramowania jako administrator, aby ustawić format wykrywania.
- **1.** Po uruchomieniu oprogramowania kliknąć ikonę "**Tools**", aby zaprogramować format wykrywania (patrz poniższy rysunek).



Otworzy się następujące okno. W oknie Tools wybrać "Detection Formats". Kliknąć przycisk "New", aby utworzyć nowy format wykrywania (Tabela 4) i zapisać go jako "RIDA[®]GENE" (patrz poniższy rysunek).



 Tabela 4:
 Konfiguracja kanału detekcji dla aparatu LightCycler[®] 480 II

Kombinacja filtrów
440 / 488
465 / 510
533 / 580
533 / 610
618 / 660

Uwaga: Ustawić wartość dla Quant Factor, Melt Factor oraz Integration Time na 1 (domyślnie).

Kliknąć przycisk "Close", aby zamknąć okno Tools.

3. Po zaprogramowaniu formatu wykrywania, kliknąć przycisk "**New Experiment**" (patrz poniższy rysunek).



4. Wybrać format wykrywania "**RIDA[®]GENE**" i wprowadzić objętość reakcji 20 μL (domyślnie) (patrz poniższy rysunek).

Window:	New Experiment				▼ User	: System Admin		
Experi-		Run Protocol	Data		Run M	lotes		
ment	Detection Format RIDA®GENE			Customize	Block Size 96	Plate ID	Reaction Volum	20 🌩
Subset Editor	Color Comp ID		Lot No	Test ID				

5. Zaprogramować profil termiczny (Tabela 5).

Tabela 5:Profil termiczny

			Ten	nperature targ	jets
Program	Cycles / Analysis Mode	Target [°C]	Acquisition Mode	Hold [hh:mm:ss]	Ramp rate [°c/s]
Initial Denat.	1 / none	95	none	00:00:30	4,4
Cycling	5 / Quantification	95	none	00:00:15	4,4
	5 / Quantinication	60	single	00:00:30	2,2
		95	none	00:00:01	4,4
TM Analysis	1 / Color Compensation	50	none	00:00:30	2,2
		70	continuous		Acquisitions (per °C) = 1 0.14*

Uwaga: Upewnić się, że liczba "Cycles" i "Analysis Mode" są prawidłowe.

* Szybkość narastania może się nieznacznie różnić w zależności od wybranego formatu detektora.

6. Po zakończeniu programowania eksperyment powinien wyglądać następująco (patrz poniższy rysunek).



7. Aby zaprogramować układ płytki mikrotitracyjnej, należy przejść do "Subset Editor". Kliknąć ikonę "Plus", aby utworzyć nowy podzbiór i wprowadzić nazwę układu (np. Color Compensation). Nacisnąć i przytrzymać klawisz Ctrl oraz lewy przycisk myszy i zaznaczyć wszystkie studzienki zawierające odczynniki na płytce mikrotitracyjnej (patrz Rys. 1 i 2). Kliknąć przycisk "Apply", aby zakończyć podzbiór. Ekran powinien wyglądać następująco (patrz poniższy rysunek).

Instrument	ent: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Connected Database: My Computer (Research)																
Window:	New Experiment											-	User:	System Adm	in		
	- Subeate		low Subset	1 settings													
Experi- ment Subset Editor	2 Color Compensati V			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	*	Ð
Sample Editor			A														22
Analysis			в														
Report							1										
Sum.			2		-	-				-							\mathbf{O}
			D													<u>-</u>	$\overline{\otimes}$
			Ε														Ŀ
			F														<i>"</i>
			G														
			н													-	
		11	ingle I		1	1			1								
	Copy Rename									<u>.</u>				Арр	ly Clear	<u>Cancel</u>]
	Template																
\wedge	▲ Warning 13.01.2021 15:21:41 Please a ▲ Warning 13.01.2021 15:21:54 Please a	activa	ate an in ate an in	strument befo	ore setting up	p a new run. p a new run.										100 •	0

8. Przejść do "Sample Editor". Od etapu 1: "Select Workflow" wybrać "Color Comp. Na etapie 2: "Select Samples", wybrać wcześniej ustawiony podzbiór (Color Compensation). Aby zakończyć układ, wybrać odpowiedni kanał dominujący dla każdego odczynnika (Blank, Dye 1, Dye 2, Dye 3, Dye 4, Dye 5) w polu "Dominant Channel" (Tabela6). Wybrać "Water" dla reakcji z kolorowym tłem (Blank) (patrz poniższy rysunek).



Tabela 6:	Ustawienia kanałı	ı dominującego d	la odczynników	(LightCycler [®]	480 II)
-----------	-------------------	------------------	----------------	---------------------------	---------

Odczynnik	Dominant Channel
Blank	Water
Dye 1	440 / 488
Dye 2	465 / 510
Dye 3	533 / 580
Dye 4	533 / 610
Dye 5	618 / 660

9. Płytkę z przygotowanymi reakcjami umieścić w urządzeniu. Kliknąć "**Experiment**", a następnie "**Start Run**", aby rozpocząć eksperyment (patrz poniższy rysunek).



8.3 Ocena i tworzenie pliku kompensacji koloru

1. Po zakończeniu eksperymentu LightCycler[®] należy kliknąć przycisk "**Analysis**" (patrz poniższy rysunek).



2. W oknie dialogowym "Create New Analysis" należy przejść do "Color Compensation". Wybrać i potwierdzić odpowiedni podzbiór (np. Color Compensation) w otwartym oknie dialogowym (patrz poniższy rysunek).



3. Otworzy się analiza. Należy kliknąć "**Calculate**", a następnie "**Save CC Object**" (patrz poniższy rysunek).



 Zapisać plik kompensacji koloru jako "RIDA[®]GENE CCIV" w folderze "CCC" (patrz poniższy rysunek).

Save Color Compensation	
P-S Boot	
E System Admin	
(+) Experiments	
Macros	
Preferences	
🖻 🔁 Special Data	
Meit Std	
Std Lurve	
	5
Name 2021 CC IV 11188 (CC)	
Diank	

Ten plik jest następnie dostępny dla innych eksperymentów na aparacie LightCycler[®] 480 II. Generowanie pliku kompensacji koloru jest teraz zakończone.

8.4 Korzystanie z pliku kompensacji koloru

Aby użyć pliku kompensacji koloru, otworzyć dany eksperyment RIDA®GENE real-time PCR i załadować żądaną kompensację koloru w polu "**Experiment**" "**Data**".W menu rozwijanym "**Color Comp (Off)**" wybrać opcję "**in Database**", a następnie zapisany plik kompensacji koloru (Rys. 2).



Rysunek 2: Korzystanie z kompensacji koloru

Po wybraniu kompensacji koloru przycisk "**Color Comp (Off)**" zmienia się na "**Color Comp (On)**". Wybrana kompensacja koloru jest automatycznie stosowana do wszystkich filtrów analizy.Cykl RIDA[®]GENE real-time PCR może być teraz analizowany jak zwykle.

Uwaga: Plik kompensacji koloru jest specyficzny dla każdego aparatu LightCycler[®] 480
 II. Nowy plik kompensacji koloru jest potrzebny w przypadku wymiany urządzenia lub naprawy zespołu optycznego.

9. Historia zmian

Numer wersji	Rozdział i oznaczenie
2021-09-09	Poprzednia wersja
2022-02-03	Zmiany ogólne: 4. Dostarczane odczynniki 5. Instrukcje dotyczące przechowywania 6. Odczynniki wymagane, ale niedostarczane 7. Ostrzeżenia i środki ostrożności dla użytkowników

10. Objaśnienia symboli

Symbole ogólne

IVD	Do stosowania w diagnostyce in vitro
Ĩ	Patrz instrukcja obsługi
LOT	Numer partii
Σ	Termin ważności
X	Temperatura przechowywania
REF	Nr kat.
\ ∑	Liczba testów
٢	Data produkcji
	Producent

Indywidualne symbole testów

Blank	Pusty
Dye 1	Barwnik 1
Dye 2	Barwnik 2
Dye 3	Barwnik 3
Dye 4	Barwnik 4
Dye 5	Barwnik 5